

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie
der Freien Universität Berlin

Geschäftsführender Direktor
Professor Dr. med. Adolf Gräßmann

**Die biologische Aktivität von mikroinjizierten
Polyoma - Viren und verschiedenen Formen der
Polyoma - DNS in Mäusezellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

KLAUS PILASKI
aus Monheim/Krs. Augsburg

1976

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie
der Freien Universität Berlin

Geschäftsführender Direktor
Professor Dr. med. Adolf Gräßmann

**Die biologische Aktivität von mikroinjizierten
Polyoma - Viren und verschiedenen Formen der
Polyoma - DNS in Mäusezellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

KLAUS PILASKI

aus Monheim/Krs. Augsburg

Referent: Professor Dr. Adolf Gräßmann

Korreferent: Professor Dr.med. Klaus Großgebauer



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 3.8.1976

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	3
2.	Aufgabenstellung	7
3.	Material und Methoden	
3.1.	Zellkulturen	11
3.1.1.	Primäre Zellkulturen von Mäusenieren	11
3.1.2.	Embryonale Mäusezellkulturen	12
3.1.3.	3T3 - Mäusezellen	12
3.2.	Polyoma - Viren	13
3.2.1.	Virusvermehrung	13
3.2.2.	Virusreinigung	13
3.2.3.	Viruskonzentrationsbestimmung	15
3.2.3.1.	Hämagglutinations - Test	15
3.2.3.2.	Plaque - Test	15
3.3.	Isolierung der Polyoma - DNS	16
3.4.	Neutraler Saccharose Gradient	17
3.5.	Caesium - Chlorid/Ethidium - Bromid Gradient	18
3.6.	Alkalischer Saccharose Gradient	19
3.7.	Milde enzymatische Behandlung der Polyoma - DNS mit pankreatischer DNase	20
3.8.	Enzymatische Spaltung der Polyoma - DNS mit zwei verschiedenen Nukleasen	21
3.8.1.	Enzymatische Spaltung der Polyoma - DNS I mit der Endonuklease EcoRI	21
3.8.2.	Enzymatische Spaltung der Polyoma - DNS III mit der Nuklease S ₁	21
3.9.	Agarosegel - Elektrophorese	22
3.10.	Herstellung der Mikrogaskanülen	24
3.11.	Injektionsvorgang	25
3.12.	Immunfluoreszenzmethode	27

	Seite
4.	Versuchsbeschreibung und Ergebnisse 29
4.1.	Infektiosität von injizierten Polyoma - Viren 29
4.2.	Präparation und Infektiosität der nativen Polyoma - DNS 31
4.3.	Präparation und Infektiosität der Polyoma - DNS II 33
4.4.	Präparation einer linearen und zirkulären Form der Polyoma - DNS und deren Infektiosität 35
4.5.	Präparation und Infektiosität einer linearen doppelsträngigen Polyoma - DNS 36
4.6.	Präparation und Infektiosität von Fragmenten der Polyoma - DNS 39
5.	Diskussion 41
6.	Zusammenfassung 48
7.	Literaturverzeichnis 50

1. Einleitung

Der experimentellen Krebsforschung sind zahlreiche verschiedene Möglichkeiten bekannt, in geeigneten Versuchstieren maligne Tumoren zu erzeugen oder aber Zellen in der Zellkultur zu transformieren, so mit Hilfe chemischer Substanzen(1), ionisierender Strahlen(2) und onkogener Viren(3). YAMAGIWA und ICHIKAWA(4) induzierten 1915 Tumoren an Kaninchenohren, indem sie diese monatelang mit einer Teerlösung bestrichen. Das erste onkogene(krebserzeugende) Virus isolierte ROUS 1911 im zellfreien Filtrat von vermeintlich spontan entstandenen Hühnersarkomen(5). Weitere Untersuchungen in den folgenden Jahrzehnten zeigten, daß dieses Virus zu der Gruppe der Ribonukleinsäure(RNS)haltigen Viren gehörte(6,7). Nach der molekularen Zusammensetzung des Nukleinsäurebestandteils unterscheiden wir Ribonukleinsäure- oder Desoxyribonukleinsäure(DNS)haltige Viren. Zu den onkogenen DNS-haltigen Viren gehört das von GROSS(1953) isolierte Polyoma-Virus(PV) (8,9) und das diesem sehr ähnliche Simian-Virus(SV₄₀), das zuerst von SWEET und HILLEMANN(1960) beschrieben wurde(10). Diese beiden DNS-Viren werden mit dem von SHOPE(1935) isolierten Papilloma-Virus(11) zur Gruppe der PAPOVA-Viren zusammengefaßt(12). Da es sich um sehr kleine Viren handelt und ihr Genom nur etwa 5-8 Gene enthält, eignen sie sich besonders gut zur experimentellen Untersuchung der viralen Carcinogenese.

Das Polyoma-Virus hat die Form eines Ikosaeders(zwanzigflächig)(13) und hat ein Molekulargewicht von 28×10^6 Dalton(14). Es enthält als genetisches Material Desoxyribonukleinsäure, die von einer Hülle aus Proteinen umgeben ist. Im reifen Viruspartikel hat die ringförmige DNS eine superhelikale Struktur(15,16,17). Das Molekulargewicht beträgt etwa 3×10^6 Dalton(16,18,19). Hieraus ergibt sich, daß das virale Genom bei asymmetrischer Genexpression(20) nur eine sehr geringe Zahl verschiedener Polypeptide mit einem Gesamt-molekulargewicht von 200 000 Dalton codieren kann. Die Hülle des Virions(Viruscapsid = V-Antigen) setzt sich aus den sechs unterschied-

lichen Proteinen(VP 1 - VP 6) zusammen(21,22). Bei VP 1 - VP 3 handelt es sich um viruscodierte Proteine(23,24), während VP 4 - VP 6 an die Polyoma-DNS assoziierte zell-spezifische Histone darstellen(24).

Eine Vermehrung der Polyoma-Viren kann sowohl in geeigneten Versuchstieren(in vivo)(25) als auch in der Zellkultur(in vitro)(26) erfolgen. Die in vitro-Infektion hat sich für die experimentelle virologische Forschung als sehr vorteilhaft erwiesen, da sich die virusinduzierten molekularbiologischen Prozesse in infizierten Einzelzellen sehr viel gezielter untersuchen lassen als im lebenden Versuchstier.

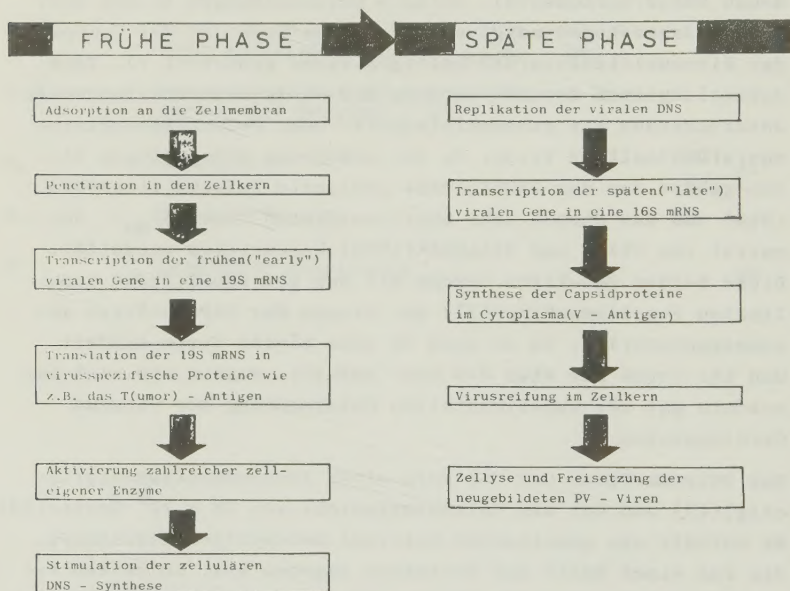


Abb. 1: Das Schema zeigt die Sequenz der einzelnen Schritte bei der Vermehrung des Polyoma-Virus in permissiven Mäusezellkulturen(p r o d u k t i v e Infektion).

Die Virusvermehrung läuft nach der Infektion mit Polyoma-Viren(p r o d u k t i v e Infektion) in den sog. permisiven Mäusezellen in z w e i Phasen ab, für die jeweils das Auftreten zweier viruscodierter Proteine in den infizierten Zellen charakteristisch ist(s. Abb.1)(27). Als erstes Genprodukt des Polyoma-Virus findet sich in der frühen Phase der Infektion das T(umor) - Antigen in den Zellkernen. Dieses virusspezifische Protein läßt sich ebenso wie das V - Antigen, das als Parameter für die späte Phase des Infektionszyklus dient, mit der Immunfluoreszenztechnik in den Mäusezellen anfärben(28,29,30,31,32,33,34)(s. Abb.1).

In einigen der mit den Polyoma-Viren infizierten Zellen (nicht-permissive Zellen) findet keine Vermehrung der Viren statt, obwohl auch in diesen Zellen das gesamte virale Genom zu finden ist(3). Es kommt nur zur Expression der frühen viralen Gene für die Dauer von 5-7 zellulären Generationszyklen(a b o r t i v e Infektion)(35). Ein kleiner Teil dieser abortiv infizierten Zellen zeigt dagegen eine dauerhafte frühe Genexpression(36,37). Das gesamte virale Genom ist fest in das genetische Material der Zellen integriert worden und geht bei jeder Zellteilung auf die Tochterzellen über(38,39,40,41). Diesen Vorgang bezeichnen wir als Transformation der infizierten Zellen(42,43). In der Zellkultur und nach Implantation in bestimmte Versuchstiere zeigen diese Zellen ein verändertes Wachstumsverhalten(44,45). Die durch das onkogene Polyoma-Virus transformierten Zellen weisen nunmehr die bekannten Charakteristika einer Tumorzelle auf(3).

Geeignete Zellkulturen lassen sich nicht nur mit den intakten Viren p r o d u k t i v oder a b o r t i v infizieren, sondern unter bestimmten Versuchsbedingungen auch allein mit der Polyoma-DNS(46,47). Allerdings ist die Infektionsrate dieser viralen DNS um den Faktor 10^{-4} - 10^{-5} niedriger als die der kompletten Viren(48). GRAESSMANN et al.(49) gelang es kürzlich, durch direkte Injektion der nackten viralen DNS in sonst durch PV-Viren nicht infizierbare Rattenmuskelzellen

eine Expression der frühen viralen Gene zu induzieren. Im Rahmen dieser Arbeitsgruppe untersuchte ich u.a. die Frage, ob mit Hilfe dieser von GRAESSMANN entwickelten Mikroinjektionsmethode(50,51,52) auch die geringe Infektionseffizienz der PV-DNS in Mäusezellen gesteigert werden kann. Die Mikroinjektionstechnik diente in weiteren Versuchsansätzen dazu, die biologische Aktivität von verschiedenen Formen der PV-DNS in Mäusezellen zu untersuchen. Diese Experimente sollten dazu beitragen, unsere Kenntnisse von den Regulationsmechanismen, die der viralen Genexpression in infizierten Zellen zugrunde liegen, zu erweitern.

2. Aufgabenstellung

a. Biologische Aktivität von injizierten Polyoma-Viren:

Das Hauptinteresse der tumorvirologischen Forschung konzentriert sich heute auf die Untersuchung der molekularbiologischen Vorgänge bei der viralen Genexpression in den mit onkogenen Viren infizierten Zellen. Bevor die genetische Information der in den Zellen freigesetzten viralen D N S überhaupt realisiert werden kann, müssen die Viruspartikel erst einmal die Zellmembran überwinden, um in das Zellinnere zu gelangen(3). Die Bedeutung dieses in mehreren Teilschritten ablaufenden klassischen Infektionsvorganges für die Entfaltung der biologischen Aktivität der Virionen innerhalb der infizierten Zellen ist uns weitgehend unbekannt. Ein Versuchsansatz dieser Arbeit soll die Frage klären helfen, ob die Polyoma-Viren ihre gesamte genetische Information in permissiven Mäusezellen nur exprimieren können, wenn sie diesen konventionellen Infektionsvorgang durchlaufen haben.

b. Bedeutung der Zellmembran für die Infektiosität der PV-DNS:

Die natürlichen Wirtszellen für das Polyoma-Virus sind Mäusezellen(8). Versucht man diese Zellen lediglich mit dem eigentlich infektiösen Bestandteil der Viruspartikel nämlich der D N S zu infizieren, so findet man in weniger als 0.1 Prozent der Zellen virusspezifische Vorgänge(48). Unsere Vermutung, daß die Ursache für diese geringe Infektionseffizienz der PV-DNS in der Membran der infizierten Zelle lokalisiert sein muß, sollte in dieser Arbeit überprüft werden.

c. Biologische Aktivität verschiedener DNS-Formen des PV - Virus:

aa. Polyoma - DNS I und II: Die native Form der PV-DNS ist ein doppelsträngiges, ringförmiges Molekül mit einer superhelikalen Struktur(s. Abb. 2). Diese PV-DNS I geht durch die Spaltung bereits einer Phosphodiesterbindung zwischen zwei Nukleotiden in die ringförmige, doppelsträng-

ige PV-DNS II über(17). Da diese beiden Formen der viralen DNS sich in einem Dichte Gradienten durch Zentrifugation trennen lassen(53,54), untersuchten wir die Auswirkung dieser Konformationsänderung der PV-DNS auf den Umfang

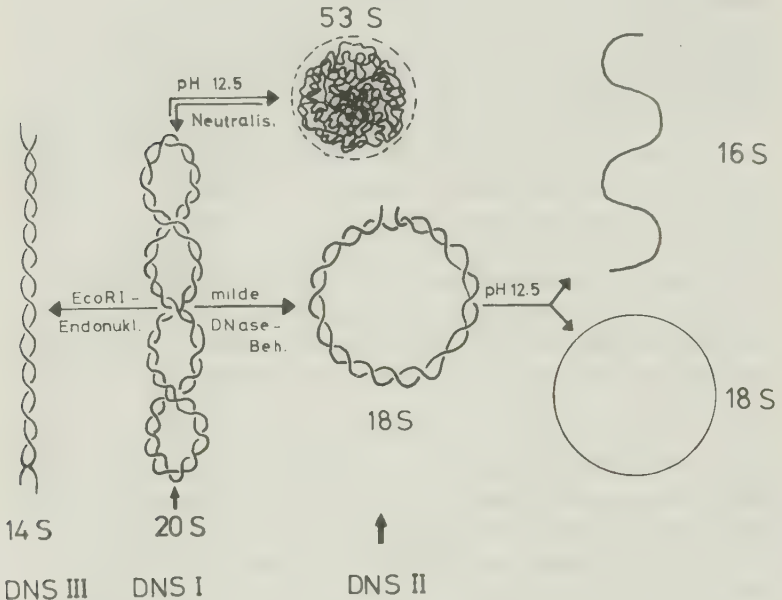


Abb. 2: Die Zeichnung veranschaulicht die Konformationsunterschiede der PV-DNS. Die PV-DNS I besteht aus einem überdrehten(superhelikalen), doppelsträngigen und ringförmig geschlossenen Molekül. Bereits ein Einzelstrangbruch läßt diese PV-DNS I in die"entspannte" PV-DNS II übergehen, die wiederum bei pH 12,5 in Einzelstränge denaturiert(16 S und 18 S). Die Superhelix der PV-DNS I geht bei pH 12,5 in die ungeordnete Struktur der 53 S DNS über oder kann durch die Endonuklease EcoRI in ein lineares, doppelsträngiges Molekül gespalten werden(PV-DNS III).

der viralen Genexpression in permissiven Mäusezellen.

bb. Lineare(16 S) und zirkuläre(18 S) Einzelstränge der Polyoma - DNS: Bei bestimmten Versuchsbedingungen gelingt die Aufspaltung der doppelsträngigen PV-DNS II in einen linearen und zirkulären Einzelstrang(s. Abb. 2)(17). Von beiden DNS-Formen können wir annehmen, daß sie sämtliche Gene des Polyoma-Virus enthalten. Für uns ergab sich daraus die interessante Frage, ob diese DNS-Einzelstränge überhaupt und wenn ja in welchem Umfang in der Lage sind, virale Gene in infizierten Zellen zu exprimieren.

cc. Lineare doppelsträngige Form der Polyoma - DNS: Wir wissen heute durch die Arbeiten von ECKHART(55,56) und WEIL(57,58), daß die Replikation der viralen D N S eine wesentliche Voraussetzung für die Expression der späten viralen Gene und damit für den produktiven Infektionszyklus in permissiven Zellen darstellt. GRAESSMANN entwickelte hieraus die Vorstellung, daß der Zusammenhang zwischen DNS - Replikation und Realisierung der späten viralen Gene möglicherweise durch eine bestimmte Konfiguration der sich replizierenden Virus - DNS bedingt ist(59). Zur Sicherung dieser Hypothese schien uns die Untersuchung der biologischen Aktivität von DNS-Einzelsträngen des PV-Virus nicht ausreichend zu sein. Wir spalteten daher die native PV - DNS I mit einer Endonuklease(EcoRI) in ein lineares doppelsträngiges Molekül (s. Abb. 2)(60,61) und untersuchten den Umfang der viralen Genexpression in permissiven Mäusezellen.

dd. Kleine Fragmente(<12 S) der Polyoma - DNS: Die enzymatische Spaltung der PV-DNS in genau charakterisierte Fragmente mit spezifischen Restriktionsenzymen erlaubt uns heute die Anfertigung einer sehr differenzierten Genkarte des Polyoma-Virus(62). Die von uns angewendete Methode der Mikroinjektion von Nukleinsäuren in geeignete Zellen bietet unter Umständen die Möglichkeit, molekularbiologische Funktionen von spezifischen und in ihrer Basensequenz be-

kannten Fragmenten der PV-DNS innerhalb eines biologischen Testsystems experimentell zu untersuchen. Um die Eignung dieser Mikroinjektionstechnik für diese Fragestellung beurteilen zu können, spalteten wir die PV-DNS mit einer unspezifischen DNase in kleine doppelsträngige Fragmente und untersuchten deren prinzipielle Fähigkeit zur frühen und späten Genexpression in Mäusezellen.

3. M a t e r i a l und M e t h o d e n

3.1. Zellkulturen

Der natürliche Wirt des Polyoma-Virus ist die Maus(8). In vitro-Zellkulturen dieser Spezies lassen sich produktiv infizieren und werden daher a. zur Vermehrung der Polyoma-Viren herangezogen und dienen b. auch zur molekularbiologischen Untersuchung der virusinduzierten Vorgänge in den infizierten Zellen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäusezellarten werden alle unter gleichen Bedingungen kultiviert(Heraeus-Brutschränke, 37° C, 100 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂-Begasung). Die Aussaat der Zellen erfolgt in Petrischalen (Falcon-Plastics, Oxuara, USA, 100 x 16 mm). Als Nährlösung für die Zellen dient das von DULBECCO(63,64) modifizierte EAGLE-Medium(Grand Island Biological Company, GIBCO, Grand Island, New York 14 072, Katalog-No. H-16), das mit 10 % Kalbsserum angereichert wird(GIBCO, Katalog-No. 617).

3.1.1. Primäre Zellkulturen von Mäusenieren:

Primärkulturen aus Nierenzellen junger Mäuse weisen eine sehr hohe Vermehrungsrate von Polyoma-Viren auf(WINOCOUR)(26).

Die Nieren(1 ¹/₂ Nieren auf eine 100 mm Ø Kulturschale)werden 10 Tage alten Mäusen(Stamm: NMRI) unter sterilen Bedingungen entnommen, mit einer Schere grob zerkleinert und bei 20° C für 30 Minuten mit einer 0.3 %igen Trypsinlösung behandelt(1 000 ml enthalten: 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.150g Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 0.2g KH₂PO₄, 3g Trypsin der Fa. Difco, 0.050g Streptomycin, 0.030g Penicillin). Dieses proteolytisch wirkende Enzym desaggregiert die einzelnen Zellen aus dem Gewebeverband ohne deren Lebensfähigkeit zu beeinträchtigen. Gewebestückchen werden nach dem Ende der Inkubationszeit mit einem Gazefilter abgetrennt und das Filtrat bei Raumtemperatur und 1 000 UpM(Umdrehungen pro Min.)

für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellsediment suspendiert man in Kulturmedium, angereichert mit Kalbsserum (10 %), und gibt von diesem Ansatz 10 ml in jede Kulturschale. Einen Tag nach der Anlage der Kultur wechselt man das Medium aus.

3.1.2. Embryonale Mäusezellkulturen:

Die Mäuseembryonen entnimmt man am 18. Tag der Schwangerschaft aus tragenden Mäusen (Stamm: NMRI), zerkleinert sie grob mit einer Schere und desaggregiert die Einzelzellen aus dem Gewebeverband in der beschriebenen Weise mit einer Trypsinlösung (0.3 % Trypsinlösung, 30 Min. bei 20° C). Der Ansatz wird dann über einen Gazefilter gegeben und das erhaltene Filtrat für 10 Minuten bei 20° C mit 1 000 UpM zentrifugiert. Das Zellsediment löst man in dem modifizierten EAGLE-Medium und gibt auf jede Kulturschale 10 ml (3×10^5 Zellen/Schale). Sekundärkulturen erhält man durch 'Abtrypsinierung' der primären Mäusezellkulturen und erneuter Aussaat unter gleichen Bedingungen.

3.1.3. 3T3 - Mäusezellen:

Embryonale Mäusezellen überleben trotz optimaler Wachstumsbedingungen in der in vitro - Zellkultur nur begrenzte Zeit. Die von TODARO und GREEN 1963 etablierte Mäusezelllinie Balb/c-3T3 (65) ist hingegen unter den in vitro-Bedingungen permanent kultivierbar. Ihr Wachstum unterliegt in der Zellkultur der Kontaktinhibition und die Zellen bilden in den Schalen lediglich einen einschichtigen Zellrasen (Monolayer).

3.2. Polyoma.- Viren

3.2.1. Virusvermehrung:

Die Vermehrung der Polyoma-Viren erfolgte für diese Arbeit ausschließlich in Primärkulturen aus Mäusenierenzellen. Die konfluieren Nierenzellen(5-7 Tage nach der Anlage der Kultur) werden nach der Absaugung des Kulturmediums mit den 3 x plaquegereinigten Polyoma-Viren des Wild Typs IL 11 beimpft(1 - 10 Plaque forming units-PFU/infiz.Zelle)(66). Nach 2 Stunden Adsorptionszeit gibt man wieder 10 ml Medium mit dem Kalbsserum in jede infizierte Schale. Die Isolierung der Viren erfolgt nach etwa 4-5 Tagen. 70-80 % der Nierenzellen sind dann lysiert und geben die neugebildeten Polyoma-Viren frei. Den Zellrasen löst man mit einem Glasstab vom Boden der Kulturschale und zentrifugiert das gesamte Material bei 20° C und 3 000 UpM für 5 Minuten. Nach der Abnahme des Überstandes, in dem sich bereits der größte Anteil der Polyoma-Viren befindet, wird das Zellsediment in 50 ml EAGLE-Medium(modifiziert) aufgenommen und 3 x bis auf -20° C in einer Tiefkühltruhe eingefroren und wieder aufgetaut. Dieses Vorgehen bewirkt die Lyse der restlichen noch intakten Nierenzellen und damit die Freisetzung weiterer Polyoma-Viren. Das Lysat zentrifugiert man dann erneut wie vorher beschrieben und vereint die beiden Überstände zu einer Viruslösung(67).

3.2.2. Virusreinigung:

Ein Teil der bei der Virusvermehrung neugewonnenen Viruspartikel(20-40 %) enthält keine Polyoma-DNS sondern lineare zelluläre DNS(67,68). Diese sog. P s e u d o v i r e n sind nicht infektiös, zeigen aber im Hämagglutinationstest(s.u.) eine positive Reaktion und führen somit zu ungenauen Konzentrationsangaben der Viruslösungen. Mit Hilfe der Plaque-Methode(66), die nur die Propagation infektiöser Viruspartikel erlaubt, erhält man von Pseudoviren weitgehend gereinigte Lösungen.

Sekundäre Zellkulturen von Mäuseembryonen(Stamm: NMRI) wer-

den in Petrischalen aus Plastik(Ø 60 mm), wie oben eingehend beschrieben, kultiviert. Die Zellen konfluieren nach einigen Tagen zu einem geschlossenen Zellrasen und werden dann mit den Polyoma-Viren infiziert(2 Stunden, 37° C, 1 - 10 PFU/Zelle). Nach Abschluß der Adsorptionsphase überschichtet man die Kultur mit einer 0.9 %igen Agarlösung. Der Agar(Fa. Merck, Darmstadt, ORDP 14/15) wird in Aqua bidest. bis zu einer Konzentration von 1.8 % gelöst und im Autoklaven bei 1.2 AtÜ für 30 Minuten sterilisiert. Durch die Verdünnung mit dem 2fach konzentrierten Kulturmedium(20 % Kalbsserum) im Verhältnis 1:1 erhält man eine 0.9 %ige Agarlösung. Um den Zellen neue Nährstoffe zuzuführen, trägt man am 4.-5. Tag nach der Infektion eine zweite Agarschicht(0.9 %) auf. Am 8. Tag p.i. überschichtet man die Zellen mit der dritten Agarschicht, die den Vitalfarbstoff Neutralrot enthält. Nach weiteren zwei Tagen, also am 10. Tag p.i., zeigen sich die ersten Plaques, die mit einer Pasteurpipette ausgestochen und in Kulturmedium gelöst werden. Den gesamten Arbeitsgang wiederholt man zweimal und erhält somit 3 x plaquegereinigte Viruslösungen(s.Abb. 3)(66). Eine weitere Möglichkeit zur Reinigung der Polyoma-Viren von Pseudoviren besteht in der Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-Gradienten(67). Beide Methoden können wahlweise zur Gewinnung reiner Viruslösungen herangezogen werden.

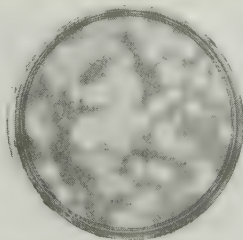


Abb. 3: Plaque-Test: Die Mäusezellen wurden mit 0.1ml Polyoma-Virenlösung(Verdünnung 1:10⁸) infiziert. Dreimal wurden die Zellen mit 0.9 %iger Agarlösung überschichtet, zuletzt mit Phenolrotzusatz. Am 10. Tag p.i. zeigen sich ca.50 Plaques. Die Konzentration der Viruslösung liegt somit bei ca. 5x10¹⁰PFU/ml.

3.2.3. Viruskonzentrationsbestimmung:

Die Konzentration der PV-Viruslösungen kann mit Hilfe des Hämagglutinationstestes und des Plaquetestes bestimmt werden(69,66).

3.2.3.1. Hämagglutinationstest: Grundlage dieses Testes ist die Fähigkeit der Polyoma-Viren, Erythrocyten vom Meerschweinchen in vitro bei einer bestimmten Viruskonzentration zu agglutinieren.

Zur Durchführung des Testes fertigt man eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Viruslösung an. In 14 kleine Glasröhrchen werden je 1 ml 0.9 %ige NaCl-Lösung gefüllt. Zu 0.1 ml Viruslg. gibt man 0.5 ml 0.9 %ige NaCl-Lösung und pipettiert diese in das 1. der 14 Glasröhrchen. Nach guter Durchmischung entnimmt man diesem Glasröhrchen 1 ml, überführt ihn in das 2. Röhrchen und verfährt analog mit den folgenden Gläschen.

Die Erythrocyten(0.5 ml) gewinnt man durch die intrakardiale Punktion beim Meerschweinchen. Nach dreimaliger Waschung in NaCl(0.9 %) mit daran anschließender Zentrifugation werden die Erys (0.5 ml) in 0.9 %iger NaCl-Lös. aufgenommen(49.5 ml). Von dieser jetzt 1 %igen Erythrocytensuspension gibt man 0.3 ml in jedes Röhrchen der vorher beschriebenen Verdünnungsreihe. Die Auswertung des Testes erfolgt am nächsten Tag(Lagerung bei 4° C im Kühlschrank)(69).

3.2.3.2. Plaquetest: Im Unterschied zu dem bei der Virusreinigung beschriebenen Vorgehen wird zur Konzentrationsbestimmung eine Verdünnungsreihe(Faktor: 10^{-6} - 10^{-12}) der zu untersuchenden Viruslösung angefertigt. Die Infektion mit den Polyoma-Viren und die mehrmalige Überschichtung mit 0.9 %igem Agar erfolgt in der gleichen Weise wie bei der Virusreinigung. Die Auszählung der Plaques, von denen einer 1 PFU repräsentiert, ist etwa am 10. Tag p.i. möglich. Viruslösungen, die weniger als 10^7 PFU/ml enthalten (dabei entsprechen 100 Viruspartikeln 1 PFU) (70), werden verworfen.

3.3. Isolierung der Polyoma - DNS

Zur Präparation der Desoxyribonukleinsäure(DNS)-Anteils der Polyoma-Viren stehen mehrere Methoden zur Verfügung. WEIL(47) beschrieb 1961 die Isolierung der viralen DNS aus den kompletten Viruspartikeln. Eine größere Ausbeute an viraler DNS ist mit der von HIRT(71) 1967 entwickelten selektiven Extraktionsmethode aus infizierten Mäusezellen zu erzielen.

100 Petrischalen(Ø 100 mm) mit konfluenten Primärkulturen aus Mäusenierenzellen(ca. 10^6 Zellen/Schale) werden mit 3 x plauegereinigten Polyoma-Viren des Stammes ILI1(72) in einer Konzentration von 0.1 - 1.0 PFU/Zelle beimpft und für 2 Stunden im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Nach dieser Adsorptionsphase gibt man 10 ml Kulturmedium auf jede Schale und kultiviert die Nierenzellen weitere 48 Stunden.

Die Isolierung der Polyoma-DNS aus den infizierten Zellen beginnt mit dem zweimaligen Waschen der Nierenzellen mit isotonem Phosphatpuffer(PBS-Puffer: 0.007 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.001 M KH_2PO_4 , 0.13 NaCl, 0.002 KCl, pH 7.2). Man überschichtet die Zellen mit je 1 ml 0.6 %igem SDS(Sodium Dodecyl Sulfat)-EDTA 0.01 M, pH 7.5 und bewirkt damit die Lyse der infizierten Zellen. Das denaturierte Zellmaterial überführt man vorsichtig in ein spitzes Zentrifugenröhrchen und stellt die Lösung durch die Zugabe von 5 M NaCl auf eine Endkonzentration von 1 M NaCl ein. Der Ansatz wird dann für 8 Stunden bei 4° C im Kühlschrank stehen gelassen und anschließend das ausgefällte Material bei 12 000 UpM in 30 Minuten bei 4° C abzentrifugiert. Der Überstand, der die virale DNS enthält, wird mit 80 %igem Phenol in 0.2 M Tris pH 8.0 behandelt(5 Min. bei Raumtemp. und 5 Min. bei 0° C schütteln) und bei 15 000 UpM für 10 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Der abgehobenen wässrigen Phase gibt man 1/10 Vol. 1 M NaCl und 2 Vol. 96 %iges Äthanol(Endkonzentration 66 %) zu und lagert das Gemisch bei -20° C für mindestens 12 Stunden in der Tiefkühltruhe.

Die gefällten Nukleinsäuren werden mit 4 000 UpM für 10 Minuten bei 4° C abzentrifugiert. Das Sediment reinigt man zweimal mit 66 %igem Äthanol von SDS- und Phenolrückständen und nimmt es in 0.1 x SSC (1 x SSC: 0.015 M NaCl und 0.0015 M Trisnatrium-citrat · 2 H₂O) auf. Die Eliminierung der RNS-Anteile wird durch die Spaltung mit RNase (50γ/ml, Worthington) für 30 Minuten bei 30° C erreicht. Das Enzym extrahiert man anschließend durch die Behandlung mit 80 %igem Phenol. Durch die Zugabe von 1 M NaCl und 2 Vol. 96 %igem Äthanol (Endkonzentration: 66 %) fällt man die DNS erneut aus der Lösung und zentrifugiert sie mit 4 000 UpM in 10 Minuten bei 4° C ab. Das Sediment wird zweimal mit 66 %igem Äthanol gewaschen und in 0.1 x SSC gelöst (52).

3.4. Neutraler Saccharose Gradient

Zur weiteren Trennung der viralen DNS von verbliebenen kontaminierenden zellulären DNS-Anteilen wird die DNS-Lösung auf einen linearen Saccharose Gradienten (5 - 20 % w/v - Gewicht/Volumen) mit neutralem pH aufgetragen. Die Saccharose ist in 1 M NaCl, 0.001 M EDTA und 0.001 M Tris-HCl, pH 7.4 gelöst. Die Zentrifugation führt man bei 54 000 UpM in einer Ultrazentrifuge (Fa. Beckmann, Typ: L 2-65 K) für 2 Std. und bei 20° C aus (Spinco SW 65 Rotor, F. Beckmann) (20). Der Gradient wird im ISCO - Fraktionator von der Oberfläche entnommen. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgt kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 254 nm in einem zwischengeschalteten ISCO - Spektralphotometer und die Meßkurve wird von einem Philips - Schreiber aufgezeichnet. Die Fraktionen mit der viralen DNS werden zusammengefaßt, gegen verdünnten Spritzpuffer (0.048 M K₂HPO₄, 0.014 M NaH₂PO₄ · 2 H₂O, 0.0045 M KH₂PO₄, pH 7.2) dialysiert und die Lösung bis zu einer DNS-Konzentration von 0.1 mg/ml lyophilisiert.

3.5. Caesium - Chlorid/Ethidium - Bromid Gradient

Die Komplexbindung des Farbstoffes Ethidium-Bromid an die PV-DNS und die sich daraus ergebenden physiko-chemischen Veränderungen ermöglichen die präparative Trennung der Polyoma-DNS I und II im Caesium-Chlorid(CsCl)/Ethidium-Bromid Gradienten. Die CsCl-Lösung hat eine Ausgangskonzentration von 1.56 g CsCl/ml mit einem Ethidium-Bromid Anteil von 100/ug/ml, das in 0.02 M Tris-HCl pH 8.0 gelöst ist. Dieser Ansatz enthält die zu untersuchende DNS-Probe und die Zentrifugation wird mit 40 000 UpM in 40 Stunden bei 20⁰ C ausgeführt(Spinco Festwinkelrotor Ti 50 der Fa. Beckmann). PV-DNS I und II bilden nach der Einstellung des Konzentrationsgleichgewichtes im Gradienten deutlich trennbare Banden bei verschiedenen Dichten der CsCl-Lösung(53). Die Fraktionierung erfolgt vom Boden des Zentrifugenröhrchens. Um die Banden mit der viralen DNS zu lokalisieren, wird eine geringe Menge aus jeder Fraktion entnommen und unter kurzweiligem UV - Licht betrachtet. Eine weitere Bestimmungsmethode ist die Messung der optischen Dichte(OD) in einem Photometer(Fa.Zeiss) bei 254 nm(52). Hierzu extrahiert man das Ethidium-Bromid durch die mehrmalige Zugabe von Isopropanol(73), das mit CsCl gesättigt ist, aus den untersuchten Proben. Für den biologischen Test faßt man die DNS-haltigen Fraktionen zusammen, dialysiert die Lösungen ausgiebig gegen verdünnten Spritzpuffer und konzentriert die virale DNS in der Gefriertrocknung.

3.6. Alkalischer Saccharose Gradient

Der alkalische Saccharose Gradient (5 - 20 % w/v) ermöglicht die Trennung der doppelsträngigen DNS II in Einzelstränge (16 S und 18 S) und eine reine Darstellung der PV-DNS I. Die Saccharose ist in 0.5 M NaCl und 1 mM EDTA gelöst. Der pH 12.5 wird mit NaOH unter Zuhilfenahme eines pH - Meters eingestellt. Die zu untersuchende Probe trägt man auf die Oberfläche des Gradienten auf und läßt zur Ausgleichung des pH die Lösung 30 Minuten stehen. Danach zentrifugiert man die Lösung mit 54 000 UpM für 5.5 Stunden bei 20° C. Die Fraktionen werden vom oberen Ende des Gradienten mit einem ISCO - Fraktionator entnommen und beim Durchlauf durch ein zwischengeschaltetes Spektral-Photometer die jeweiligen optischen Dichten bei 254 nm gemessen und in einem Philipsschreiber aufgezeichnet. Die DNShaltigen Fraktionen faßt man zu einer Lösung zusammen und neutralisiert diese mit HCl. Die Saccharose eliminiert man durch anschließende Dialyse gegen verd. Spritzpuffer und erhält schließlich durch Gefriertrocknung eine Konzentration der viralen DNS von 0.1 mg/ml.

3.7. Milde enzymatische Behandlung der Polyoma-DNS mit pankreatischer DNase

a. Um die PV-DNS I(20 S) in die PV-DNS II(16 S) zu überführen, behandelt man die aus einem CsCl-Ethidium Bromid gewonnene PV-DNS I mit pankreatischer DNase(Worthington)(74). Der Reaktionsansatz von 1 ml mit 5 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5 mM $MgCl_2$ - Lösung, 20 μ g Serumalbuminen vom Rind(Calbiochem, A grade) enthält 6-8 μ g virale DNS I und 2.5×10^{-3} μ g/ml DNase. Die enzymatische Spaltung findet bei 0° C in 5 Minuten statt und wird durch die Zugabe von SDS und EDTA gestoppt. Das Enzym extrahiert man mit 80 %igem Phenol(wie bei der DNS-Isolierung beschrieben) und fällt die virale DNS II mit Äthanol aus(74).

b. Für die Darstellung von doppelsträngigen DNS-Fragmenten(12 S) wird die PV-DNS I in einem wie oben beschriebenen Ansatz mit DNase für 15 Minuten bei 22° C inkubiert. Die Reaktion stoppt man ebenfalls mit SDS und EDTA und extrahiert das Enzym mit 80 %igem Phenol. Um sicher sein zu können, daß die PV-DNS I vollständig in Fragmente gespalten ist, schließt sich eine Zentrifugation der Probe in einem neutralen Saccharose Gradienten an. Die Fraktionen mit den DNS-Fragmenten werden zusammengefaßt und erneut auf einen neutralen Saccharose Gradienten(5 - 20 %w/v) gegeben. Von diesem zweiten Gradienten faßt man nur die Fraktionen mit DNS-Fragmenten < 12 S zusammen, dialysiert diese gegen verd. Spritzpuffer und engt die DNS-Fragmente auf eine Konzentration von 1 mg/ml ein.

3.8. Enzymatische Spaltung der Polyoma-DNS mit zwei verschiedenen Nukleasen

3.8.1. Enzymatische Spaltung der Polyoma-DNS I mit der Endonuklease EcoRI:

Die Spaltung der PV-DNS I mit der E.coli Restriktions Endonuklease RI(Miles, USA) ergibt eine lineare doppelsträngige virale DNS(PV-DNS III)(60,61). Ein Reaktionsansatz von 300/ul mit 0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.01 M $MgCl_2$, 0.05 M NaCl enthält 30/ug Polyoma-DNS I und 30/ul Enzymlösung(die käufliche Enzymlösung wird vorher 1:10 verdünnt). Der Ansatz wird für 30 Minuten bei 37° C inkubiert und die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 30/ul 0.5 M EDTA gestoppt. Man extrahiert das Enzym durch die Behandlung mit einem Chloroform/Isoamylalkoholgemisch(24:1) bei 4° C für 5 Minuten(75). Die wässrige Phase wird abgetrennt und die darin enthaltene PV-DNS III mit 1/10 Volumen 1 M NaCl und 2.5 Volumen Äthanol ausgefällt. Die Probe lagert man hierzu für 12 Stunden bei -20° C in der Tiefkühltruhe.

3.8.2. Enzymatische Spaltung der PV-DNS III mit der Nuklease S_1 :

Zur Abspaltung der endständigen Nukleotide der doppelsträngigen PV-DNS III schließt man eine Behandlung mit der Nuklease S_1 aus *Aspergillus oryzae*(Miles, USA)(76,77) an. Ein Reaktionsansatz von 300/ul mit 0.05 M Na-Acetat pH 4.5, 0.001 M $ZnSO_4$, 0.03 M NaCl enthält 30/ug PV-DNS III und 15/ug S_1 - Enzym. Die Lösung inkubiert man bei 37° C für 30 Minuten und stoppt die Reaktion mit 30/ul 0.5 M EDTA. In der oben beschriebenen Weise extrahiert man dann die Nuklease aus dem Ansatz mit Chloroform/Isoamylalkohol und fällt die DNS mit Äthanol und NaCl - Lösung. Die abzentrifugierte PV-DNS trennt man elektrophoretisch von nicht gespaltenen PV-DNS I-und II - Anteilen auf einer Agarosegelsäule(s.nächste Seite)

3.9. Agarosegel - Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese dient der Charakterisierung der PV-DNS III und ihrer Trennung von anderen DNS-Formen(78). Zur Herstellung der Gelsäulen gibt man die Agarose(1.4 % w/v) (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg) in Elektrophoresepuffer (0.03 M NaH_2PO_4 , 0.036 M Tris, 0.001 M EDTA, pH 7.7) und sterilisiert die Lösung für 30 Minuten im Dampftopf(78). Dann läßt man den Ansatz auf 50° C abkühlen und saugt währenddessen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe die in der Lösung enthaltene Luft ab, um später homogene Gelsäulen zu erhalten. Die noch flüssige Agarose-Lösung wird in Glasröhrchen(10 x 0.6 cm i.D.) eingefüllt und gelatiniert bei Raumtemperatur. Das obere Ende des Gels wird mit einer Rasierklinge plan geschnitten, um eine gleichmäßige Startfläche für die DNS-Probe zu erzielen. Das untere Ende des Glasröhrchens verschließt man mit einer Dialysemembran, so daß die Gelsäule nicht herausrutschen kann. Der zu untersuchenden Probe wird Saccharose bis zu einer Endkonzentration von 8 % und Bromphenol Blau bis zu 0.025 % zugegeben, das ein sichtbar gleichmäßiges Auftragen auf die Säule ermöglicht. Die Elektrophorese wird in einem Gerät der Fa. ISCO, USA, Mod. 419 - in dem die 13 einspannbaren Säulchen vertikal angeordnet sind und in E-Puffer tauchen - bei Raumtemperatur mit 80 V in 90 Minuten ausgeführt. Um die Bande der PV-DNS III sichtbar zu machen, nimmt man eine der Gelsäulchen aus dem Glasröhrchen heraus und färbt es für 30 Minuten in Ethidium-Bromid Lösung(5 µg/ml E - Puffer). Dieser Farbstoff wird in die virale DNS 'interkaliert', so daß diese dann in kurzweiligem UV-Licht fluoresziert. Das Ergebnis der Elektrophorese hält man photographisch fest(Polaroid, 55 P/N, Kodak Rotfilter No.23A). Soll die biologische Aktivität der PV-DNS III in Zellen getestet werden, schneidet man die entsprechende Bande aus der Gelsäule heraus und unterwirft dieses Gelstück erneut einer Elektrophorese. Die PV-DNS III wird somit aus der Agarose eluiert, anschließend in einem Dialyseschlauch

aufgefangen und ausgiebig gegen verdünnten Spritzpuffer dialysiert. Die Endkonzentration der PV-DNS III beträgt nach Einengung in der Gefriertrocknung 0.1mg/ml.

3.10. Herstellung der Mikroglaskanülen

Die Fertigung der Glaskanülen zur Mikroinjektion der Viren und DNS-Lösungen erfolgt weitgehend nach der von GRAESSMANN beschriebenen Methode(79,80). Als Ausgangsmaterial dienen Glasröhrchen(SGC, Scientific Company, USA) mit einem Außendurchmesser von 1.2 - 1.5 mm und einem Innendurchmesser von 1.0 mm. Nach der Vorreinigung in Nitriergemisch (konz. HNO_3 und konz. H_2SO_4 im Verhältnis 2:1) für 12 Stunden werden die Röhrchen für 24 Stunden unter fließendem Wasser gespült und anschließend ausgiebig in bidestilliertem Wasser ausgewaschen und zum Abschluß bei 130°C in 12 Stunden getrocknet. Um den Durchmesser der Röhrchen auf etwa 0.3 mm zu verringern, erhitzt man die Mitte des Glases (Länge: 20 cm) über der Sparflamme des Bunsenbrenners und zieht es von Hand aus. Dieses vorgezogene Glasröhrchen wird in ein von GRAESSMANN selbstgebautes 'Ausziehgerät' gespannt, das aus zwei Haltern besteht, die auf einer Gleitschiene laufen und von zwei Federn auseinandergezogen werden. Das ausgedünnte Mittelstück liegt dabei in einer heizbaren Platindrahtschlinge. Bei einer Stromstärke von 7 - 8 Ampere ist nach etwa 5 - 10 Sekunden der Schmelzpunkt des Glases erreicht und das Glasröhrchen wird von den Federn zu zwei gleich geformten Mikrokanülen auseinandergezogen. Die erzielte Kanülenstärke läßt sich durch Veränderung der Feder- spannung und der Stromstärke variieren. Nach der Überprüfung der Form und Stärke der Glaskanüle unter einem Mikroskop wird die Spitze in 50 %iger Flußsäure(1 Sek.) gereinigt und in Aqua bidest. ausgewaschen. Verbleibende Verunreinigungen werden durch zweimaliges Aufziehen und Ausblasen von reinem Äthanol entfernt. Die abschließende Sterilisation erfolgt bei 130°C für 4 Stunden im Trockenschrank (79,80).

3.11. Injektionsvorgang

Für die Injektionsversuche werden die Zellen auf Glasplättchen(10 x 50 mm) in Petrischalen kultiviert. Zur Orientie-



Abb. 4: Die vier Phasen der verschiedenen Phasen der Mikrinjektionstechnik.
(1) Die Spitze der Mikroglasskanüle befindet sich neben der Mutterzelle. (2) Die Kanülenspitze wird in den Zellkern eingeführt. (3) Der Injektionsvorgang ist abgeschlossen. Die Mikroglasskanüle liegt wieder außerhalb der Zelle. (4) Die Injektion der PV-DNA erfolgt unter einem Phasenkontrastmikroskop bei 400-facher Vergrößerung. In den Vor- und Rückansichten sind die Kanülen zu sehen, die der Kondensor beleuchtet.

nung und zur Lokalisierung der injizierten Zellen sind die Glasplättchen in Quadrate mit einer Fläche von 1 mm^2 unterteilt. Die Mikrokanüle wird in einen Mikromanipulator der Fa. Leitz eingespannt und mit einem Kunststoffschlauch an eine Handspritze angeschlossen. Nach Aufsaugung der zu injizierenden Substanz führt man den Injektionsvorgang unter einem Phasenkontrastmikroskop (Fa. Leitz) bei 400facher Vergrößerung durch (s. Abb. 4). Ein Glasplättchen mit Zellen wird dazu in eine Petrischale ($\varnothing 6 \text{ cm}$) gelegt und mit Medium bedeckt. Um den pH während der Injektion konstant zu halten, läßt man über das mit Bikarbonat gepufferte Medium CO_2 - Gas strömen.

3.12.° Immunfluoreszenzmethode

Die Bildung des virusspezifischen T - und V - Antigens in den infizierten Zellen als Ausdruck der frühen und späten viralen Genexpression läßt sich mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode mikroskopisch nachweisen. (Die verwendeten Antisera wurden freundlicherweise von Prof. Marian Fogel vom Weizmann - Institut/Israel zur Verfügung gestellt).

Nach Ablauf der festgelegten Stundenzahl werden die Glasplättchen mit den infizierten Zellen aus den Kulturschalen entnommen, an der Luft getrocknet und in einem Methanol - Aceton Gemisch(1:2) bei -20°C für 10 Minuten in der Tiefkühltruhe fixiert. Nach Abschluß der Fixierung werden die Plättchen erneut an der Luft getrocknet.

Das V - Antigen(Viruscapsid) kann mit der direkten Immunfluoreszenzmethode in den permissiven Mäusezellen nachgewiesen werden. Der Antikörper(vom Kaninchen) gegen das Viruscapsid ist mit dem Farbstoff Fluoreszein markiert.

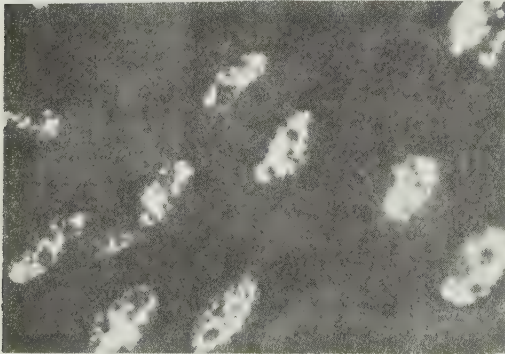


Abb.5: In sekundäre Mäusezellen wurde PV - DNS I injiziert und die Zellen wurden nach 48 Stunden in der beschriebenen Weise mit der indirekten Immunfluoreszenzmethode für das T - Antigen gefärbt. Vergrößerung: 1:400.

Von dem Antiserum gegen das Viruscapsid, das vorher mit PBS-Puffer 1:1 verdünnt wurde, werden ca. 20 μ l mit einem Glasstab vorsichtig auf die Zellen aufgetragen und das Plättchen dann in einer feuchten Kammer (Brutschrank) bei 37° C für 30 Minuten inkubiert. Die sich daran anschließende ausgiebige Wässerung in PBS-Pufferlösung für 10 Minuten mit darauffolgender Lufttrocknung beseitigt die überschüssigen Serumanteile.

Der Nachweis des in der frühen Phase der Virusinfektion von den PV-Viren induzierten T - Antigens erfolgt mit der i n d i r e k t e n Immunfluoreszenzmethode. Der Antikörper (im Hamster gewonnen) gegen das virusspezifische T - Antigen läßt sich nicht mit Fluoreszein beladen. Man markiert daher einen zweiten Antikörper, der gegen den ersten gerichtet ist und im Kaninchen gewonnen wurde, mit dem Farbstoff. Nach der Färbung der Zellen mit dem 1. Antiserum (Vorgehen wie oben beschrieben) wird das 2. Antiserum aufgetragen, das Plättchen dann bei 37° C im wasserdampfgesättigten Brutschrank für 30 Minuten aufbewahrt und schließlich mehrmals in PBS-Puffer gewässert. Die Auszählung der sich anfärbenden Zellen (s. Abb. 5) erfolgt unter einem Fluoreszenzmikroskop (Fa. Zeiss Ikon) mit einem Dunkelfeldkondensor im UV-Grenzbereich bei 400 facher Vergrößerung.

4. Versuchsbeschreibung und Ergebnisse

4.1. Infektiosität von injizierten Polyoma - Viren:

Die Polyoma-Viren werden aus infizierten Mäusenierenzellen isoliert(s.a. Material und Methoden) und mit der Plaque-Methode gereinigt(3 x). Die Injektion der Viruslösung in 3T3-Mäusezellen erfolgt unter einem Phasenkontrastmikroskop(s.Abb.4) bei 400 facher Vergrößerung mit Hilfe von Mikrogaskanülen, die in einem Mikromanipulator geführt werden. Bei dem in Abbildung 4 dargestellten Injektionsvorgang werden in jede der auf Glasplättchen wachsenden 3T3-Mäusezellen etwa $5 \times 10^{-12} - 10^{-11}$ ml der Viruslösung injiziert. In diesem Volumen sind ca. 50 - 100 Viruspartikel enthalten. Nach Abschluß des Injektionsvorganges überführt man die Zellen wieder in eine Petrischale mit Kulturmedium und kultiviert sie für 48 Stunden im Brutschrank unter den bereits beschriebenen Standardbedingungen(Modifiziertes EAGLE-Medium mit 10 % Kalbsserum, 37°C , CO_2 - Begasung).

Der Nachweis des T - und V - Antigens mit Hilfe der indirekten und direkten Immunfluoreszenztechnik zeigt, daß nach 48 Stunden 100 % der infizierten 3T3-Zellen das T - Antigen und 42 % das V - Antigen enthalten(s. Tabelle). Diese hohen Prozentzahlen nach Injektion der PV-Viren lassen den Schluß zu, daß eine 48stündige Inkubationsdauer ausreichend ist für den Nachweis einer vollständigen viralen Genexpression. Nimmt man für diesen Versuch nicht die 3T3-Zelllinie, sondern sekundäre embryonale Mäusezellen, so ergeben sich keinerlei Unterschiede in der Synthese der virusspezifischen Antigene. Wir verwendeten daher in den folgenden Versuchen nur noch die käuflichen und leichter zu handhabenden 3T3-Mäusezellen.

T A B E L L E 1

Die Tabelle gibt die Prozentzahlen der T - und V - Antigen positiven 3T3 - Zellen nach der Injektion von kompletten Polyoma - Viren oder verschiedener PV - DNS - Formen wieder. Die Mäusezellen wurden nach 48stündiger Inkubation p.i. mit der indirekten oder direkten Immunfluoreszenz - Technik gefärbt.

INJIZIERTE SUBSTANZEN	T-ANTIGEN in %	V-ANTIGEN in %
Komplette PV-Viruspartikel (10 ¹¹ PFU/ml)	100	42
PV - DNS I (20 S) (0.3 mg/ml)	100	35
PV - DNS II (16 S) (0.3 mg/ml)	34	12
Linearer DNS-Einzelstrang(16 S) (0.3 mg/ml)	32	0
Zirkulärer DNS-Einzelstrang(18 S) (0.3 mg/ml)	32	0
Linearer <u>und</u> zirkulärer DNS - Einzelstrang (16 S und 18 S)	32	6
PV-DNS Fragmente (< 12 S) (0.1 mg/ml)	8	0

Lineare, doppelsträngige PV-DNS (1 mg/ml) nach <u>24</u> und <u>48</u> stündiger Inkubation p.i.	0	0

Für jeden Versuch wurden 3×10^2 3T3 - Zellen mit der Mikroinjektionstechnik infiziert. Etwa 5×10^{-12} - 10^{-11} ml wurden in jede Mäusezelle injiziert.

4.2. Präparation und Infektiosität der nativen Polyoma - DNS I

Die native Form der doppelsträngigen Polyoma-DNS(PV-DNS I) ist ein ringförmiges Molekül mit einer superhelikalen Struktur(s.Abb.2) und einer Sedimentationskonstante von 20 S(Svedberg-Konstante). Wird die Phosphodiesterbindung zwischen mindestens zwei Nukleotiden der viralen DNS I gespalten, so geht die Superhelix in die Ringform der PV - DNS II über. Die Sedimentationskonstante dieser Form der viralen DNS beträgt 16 S.

Die Polyoma-DNS wird aus infizierten Mäusenierenzellen nach der von HIRT beschriebenen Methode isoliert(71)(s.a. Material u. Methoden). Nach der Behandlung mit 80 %igem Phenol und der Fällung in Äthanol reinigt man die virale DNS weiter von zellulärer DNS durch die Zentrifugation in einem neutralen Saccharose Gradienten(5-20 % w/v)(ohne Abbildung). Die Fraktionen mit der viralen DNS werden zusammengefaßt, dialysiert und entweder in einem CsCl-Ethidium Bromid oder einem alkalischen Saccharose Gradienten zentrifugiert.

Bei der Zentrifugation im CsCl-Ethidium Bromid Gradienten werden nach Erreichung des Gleichgewichtes die Fraktionen 8 - 12 mit der PV-DNS I zusammengefaßt und das für die Zellen toxische Ethidium Bromid mit einer zweimaligen Iso-propanol-Behandlung aus der Lösung entfernt(s. Abb.6). Das Caesium-Chlorid wird durch ausgiebige Dialyse gegen verd. Spritzpuffer aus der PV-DNS I Präparation entfernt. Diese Trennung der PV-DNS I von der ringförmigen PV-DNS II wird durch das Ethidium Bromid ermöglicht. Dieser Farbstoff wird in doppelsträngige DNS-Moleküle eingelagert(interkaliert) und bewirkt eine reversible Konformationsänderung der DNS. Da die superhelikale Tertiärstruktur der PV-DNS I in sehr viel stärkerem Umfang durch das Ethidium Bromid verändert wird als die Ringform der PV-DNS II, bilden diese beiden PV-DNS Formen deutlich trennbare Banden im CsCl - Ethidium Bromid Gradienten.

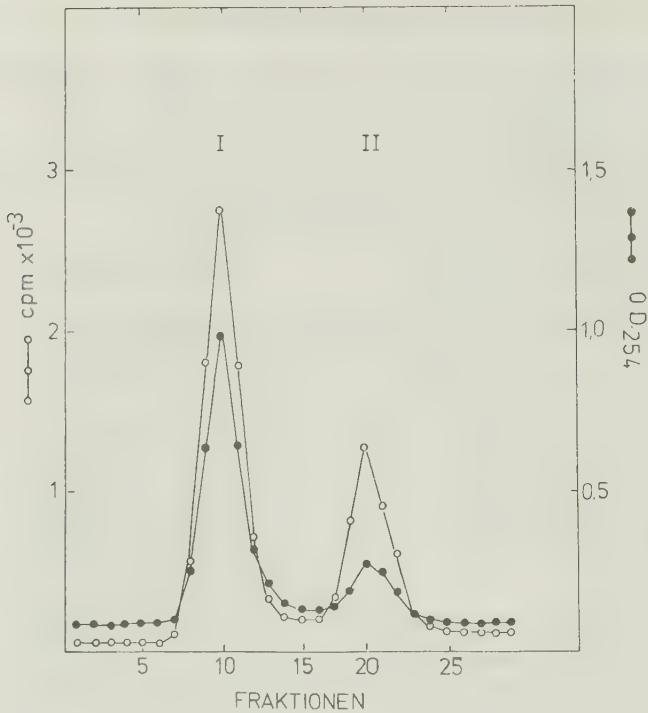


Abb. 6: Die auf einem neutralen Saccharose Gradienten vorgereinigte PV-DNS (Spinco Rotor SW 65, 20° C, 2 Std., 54 000 UpM) wurde in einem CsCl-Ethidium Bromid Gradienten zentrifugiert (Spinco Festwinkel Rotor Ti 50, 40 Std., 40 000 UpM). Dem Ansatz wurde mit Tritium radioaktiv markierte PV-DNS hinzugefügt (81). Die Fraktionierung des Gradienten erfolgte vom Boden des Zentrifugenröhrchens. Nach der Extrahierung des Farbstoffes wurde die optische Dichte (OD) bei 254 nm gemessen und die Radioaktivität (cpm) der Marker-DNS bestimmt. Die PV-DNS I bildet eine Bande bei der Dichte des CsCl von 1.589 g/cm³, während die PV-DNS II bei 1.556 g/cm³ sedimentiert. Die PV-DNS I erhält man aus den Fraktionen 8 - 12.

Alternativ kann man die PV-DNS I aus einem alkalischen Saccharose Gradienten isolieren, da die PV-DNS II beim pH 12.5 in zwei Einzelstränge denaturiert wird, während die PV-DNS I r e v e r s i b e l in eine dichtere und ungeordnete Form (53 S) übergeht (s. Abb. 2). Der Gradient wird nach der Zentrifugation fraktioniert und die Fraktionen 17 - 20 zusammengefaßt. Nach der Neutralisation mit HCl und der Dialyse gegen verdünnten Spritzpuffer engt man die PV-DNS durch Lyophilisierung bis zu einer Endkonzentration von 0.1 mg/ml ein (s. Mat. u. Meth. u. Abb. 7).

Die Testung der biologischen Aktivität dieser auf verschiedene Weise gewonnenen PV-DNS I erfolgt in 3T3 - Zellen. Man injiziert die virale DNS mit Hilfe der oben beschriebenen Mikroinjektionsmethode in den Zellkern oder das Cytoplasma der Mäusezellen und kultiviert diese dann für 48 Stunden im Brutschrank. Nach der Fixierung der infizierten Zellen weist man das T - und V - Antigen mit der Immunfluoreszenzmethode in den Zellen nach. Die PV - DNS I konnte in 100 % der 3T3-Zellen das T-Antigen und in 32 % das V-Antigen induzieren. Das Ausmaß der frühen oder späten viralen Genexpression ist dabei unabhängig von der Art der Präparation der PV-DNS I (s. Tab. 1 und Abb. 7)

4.3. Präparation und Infektiosität der Polyoma - DNS II

Die Isolierung der PV-DNS II erfolgt nicht aus der entsprechenden Bande des CsCl-Ethidium Bromid Gradienten, da in diesen Fraktionen neben der viralen DNS II noch zelluläre DNS enthalten ist. Man unterwirft daher die reine PV-DNS I einer milden Behandlung mit pankreatischer DNase. Dieses Enzym spaltet die Diesterbindung zwischen zwei Nukleotiden der DNS und überführt auf diese Weise die PV - DNS I (20 S) in die PV-DNS II (16 S)! Diese "genickte" DNS wird in der beschriebenen Weise in 3T3-Mäusezellen injiziert und die Zellen dann für 48 Stunden im Brutschrank kultiviert. Das T - Antigen als Parameter der frühen viralen Genexpression konnten wir in 34 % der infizierten

Zellen nachweisen, während das V - Antigen in 12 % der 3T3-Zellen zu finden war(s. Tabelle 1).

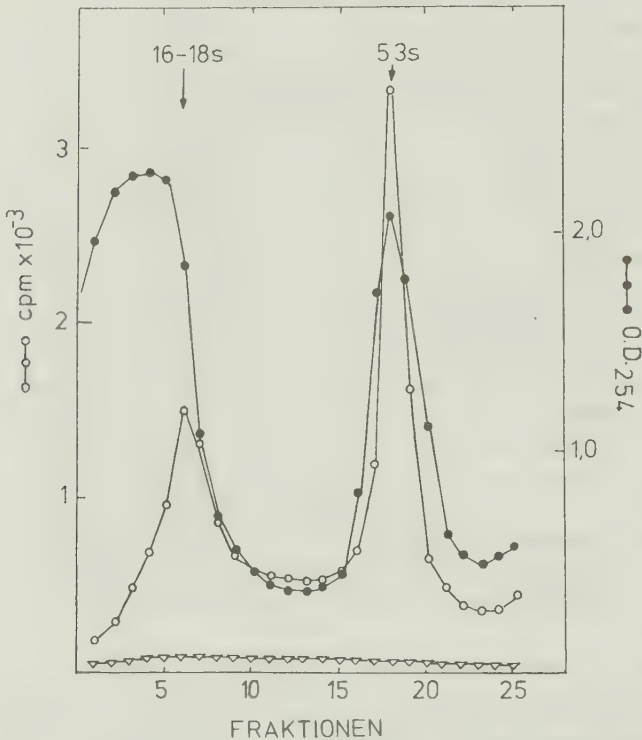


Abb. 7: Die PV-DNS wurde nach der von HIRT(71) beschriebenen Methode aus infiz. Mäusenierenzellen isoliert und nach der Vorreinigung in einem neutr. Sacch. Gradienten auf den alkalischen Saccharose Gradienten gegeben(Spinco SW 65 Rotor, 2 Std., 54 000 UpM, 20°C, pH 12.0). Der Gradient wurde von oben fraktioniert und die optische Dichte simultan gemessen(●-●). Ein Teil der mit den Polyoma-Viren infiz. Schalen wurde zwischen der 29-31 Stunde p.i. mit ^3H Thymidin (25 μCi /Schale)markiert(radioaktiv mark.DNS aus infiz. Schale:○-○ /radioaktiv mark.DNS aus nicht infiz.Schale:(▽-▽). Die Messung der Radioaktivität erfolgte nach BOLLUM(81).

4.4. Präparation einer linearen und zirkulären Einzelstrang- Form der Polyoma - DNS und deren Infektiosität

Die doppelsträngige PV-DNS II denaturiert unter alkalischen Bedingungen in einen linearen(16 S) und einen zirkulären(18 S) DNS-Einzelstrang. Zur Trennung nach rein physikalischen

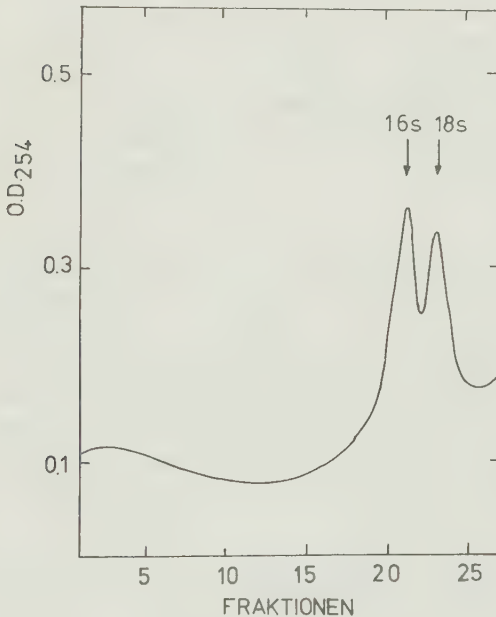


Abb. 8: PV -DNS II wurde in einem alkalischen Saccharose Gradienten zentrifugiert(5-20 % w/v, pH 12.5, 54 000 UpM, 20°C). Die Fraktionierung erfolgte vom oberen Ende des Gradienten und die optische Dichte wurde gleichzeitig photometrisch bei 254 nm bestimmt. Die Fraktionen 18-21 mit der linearen PV-DNS(16 S) und die Fraktionen 23-25 mit der zirkulären PV-DNS(18 S) wurden jeweils zusammengefaßt.

Eigenschaften(unterschiedliches Sedimentationsverhalten) gibt man die PV-DNS II auf einen alkalischen Saccharose Gradienten(pH 12.5). Die Fraktionen 18-21 enthalten den linearen DNS-Einzelstrang(16 S), während sich der zirkuläre DNS-Einzelstrang(18 S) in den Fraktionen 23-25 befindet(s. Abb. 8).Man faßt die Fraktionen jeweils zu einer Lösung zusammen und neutralisiert sie mit HCl. Um die Saccharose aus den Präparationen zu entfernen, dialysiert man sie gegen verdünnten Spritzpuffer und engt die PV - DNS auf eine Konzentration von 0.3 mg/ml ein. Nach der Injektion in 3T3-Mäusezellen findet sich in 32 % der infizierten Zellen eine Synthese des T - Antigens. Keine der Mäusezellen zeigt eine Expression der späten viralen Gene. Die beiden Einzelstrangformen wurden getrennt untersucht(s. Tab.1).

Um nachprüfen zu können, ob der lineare und zirkuläre Einzelstrang der PV-DNS bei gemeinsamer Injektion eine veränderte Genexpression aufweist, vermischten wir beide Präparationen und injizierten diese DNS-Lösung dann in 3T3 - Zellen. Nach 48 Stunden Inkubation p.i. im Brutschrank synthetisierten 6 % der infizierten Zellen das V - Antigen als Ausdruck der späten viralen Genexpression. Der Umfang der frühen viralen Genexpression entsprach den Werten(32 %), die nach getrennter Injektion der Einzelstränge erzielt werden(s. Tab. 1).

4.5. Präparation und Infektiosität einer linearen doppelsträngigen Form der Polyoma - DNS

Das Restriktionsenzym EcoRI(Endonuklease) aus E.coli Bakterien spaltet den Doppelstrang der PV-DNS I an einer einzigen spezifischen Stelle im Molekül. Diese Spaltungsstelle liegt in dem Teil des viralen Genoms, der die genetische Information enthält, die in der frühen Phase der Virusinfektion in den Zellen exprimiert wird. Die Abb. 9 zeigt sehr vereinfacht und schematisiert eine Genkartierung des Polyoma-Virus, wobei zahlreiche weitere Spaltungspunkte

von uns bekannten Restriktionsenzymen nicht berücksichtigt werden.

Die PV-DNS I wird zu den unter 'Material und Methoden' beschriebenen Bedingungen mit der Endonuklease EcoR I

GENKARTE des POLYOMA VIRUS

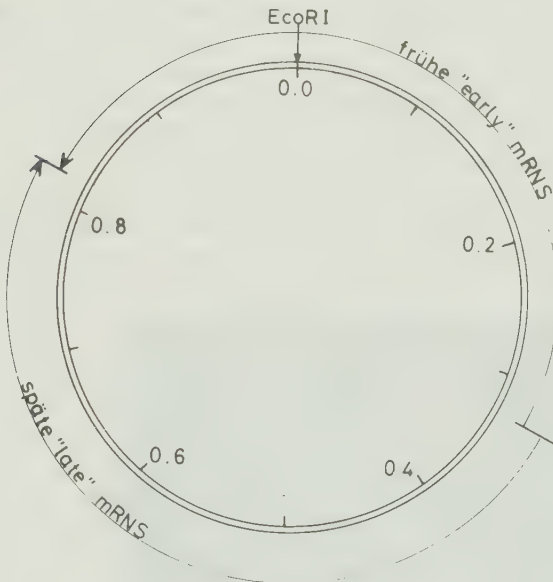


Abb. 9: Das Restriktionsenzym EcoRI (Endonuklease) spaltet den Doppelstrang der ringförmig geschlossenen PV-DNS an einer spezifischen Stelle mit typischer Basensequenz. Dieser Punkt wird als 0.0 definiert und dient als Bezugspunkt für andere bekannte Restriktionsenzyme mit jeweils verschiedenen Spaltungsstellen. Weiter ist aus der Zeichnung die Anordnung der frühen und späten Genregion auf der DNS zu sehen, sowie deren entgegengesetzte Transcriptionsrichtung.

für 30 Minuten inkubiert. Man stoppt die Reaktion durch die Zugabe von EDTA und extrahiert das Enzym mit einem Gemisch aus Chloroform/Isoamylalkohol(60,61). Um sicher zu sein, daß intrazellulär nach der Injektion keine Rezyklisierung dieses linearen doppelsträngigen Moleküls(PV-DNS III) eintritt, schließt man zusätzlich eine Behandlung mit der Nuklease S_1 an(76,77). Dieses Enzym spaltet die endständigen, zueinander passenden Nukleotide("sticky ends") ab, ohne bei den gewählten Versuchsbedingungen die Diesterbindungen der doppelsträngigen DNS-Anteile aufzuspalten. Das S_1 - Enzym wird ebenfalls für 30 Minuten bei 37°C mit der PV-DNS III inkubiert, die Reaktion dann mit EDTA gestoppt und das Enzym mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Nach Abschluß dieser beiden enzymatischen Spaltungen fällt man die virale DNS mit Äthanol aus. Um die Gewißheit zu haben, daß keine PV-DNS I oder II in der Lösung verblieben sind, wird eine Agarosegel - Elektrophorese angeschlossen(s.Mat. u. Meth.),

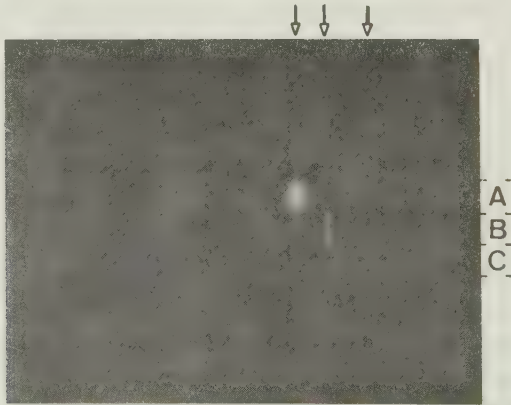


Abb. 10: Das Polaroid-Foto zeigt die mit Ethidium Bromid gefärbten Banden verschiedener Formen der PV-DNS in drei Agarosegel-Elektrophoresen(1.4 %). (A) links:PV-DNS I, rechts: PV-DNS II.(B)PV-DNS III n. S_1 -Behandlung.(C) PV-DNS II.

die eine deutliche Trennung der S_1 - behandelten PV-DNS III von den beiden anderen DNS-Formen(PV-DNS I u.II) erlaubt (s. Abb. 10). Mit einer zweiten Elektrophorese gewinnt man die lineare doppelsträngige PV-DNS aus dem Agarosegel(Gel-säule B in Abb.10) zurück, dialysiert die Lösung ausgiebig gegen verdünnten Spritzpuffer und injiziert die PV-DNS in einer Konzentration von 1 mg/ml(s. Mat.u. Meth.) in 3T3 - Zellen.Weder nach 24 noch nach 48 Std. p.i. konnten wir in den inf. Zellen eine virusspez.Veränderung nachweisen.

4.6. Präparation und Infektiosität von Fragmenten der Polyoma - DNS

Unspezifisch gespaltene Fragmente der PV-DNS erhält man durch die Behandlung der PV-DNS I mit pankreatischer DNase für 15 Minuten bei 22° C(s. Mat. u. Meth.). Nach Abschluß der enzymatischen Spaltung wird die virale DNS auf einen neutralen Saccharose Gradienten(5 - 20 %w/v) gegeben, um eine Trennung der Fragmente von den unversehrten PV-DNS I Molekülen zu erreichen(ohne Abbildung). Alle Fraktionen mit einer Sedimentationskonstante kleiner als 12 S werden zusammengefaßt und erneut in einem neutralen Saccharose Gradienten zentrifugiert(s. Abb. 11). Die PV-DNS Fragmente injiziert man nach vorhergehender Dialyse der zusammengefaßten Fraktionen 1-5 und Einengung auf eine Konzentration von 0.1 mg/ml in permissive 3T3-Mäusezellen.Nach 48 stündiger Inkubationszeit findet sich in 8 % der Mäusezellen das T - Antigen, während die V - Antigenfärbung in allen infizierten Zellen negativ bleibt(s. auch Tabelle 1).

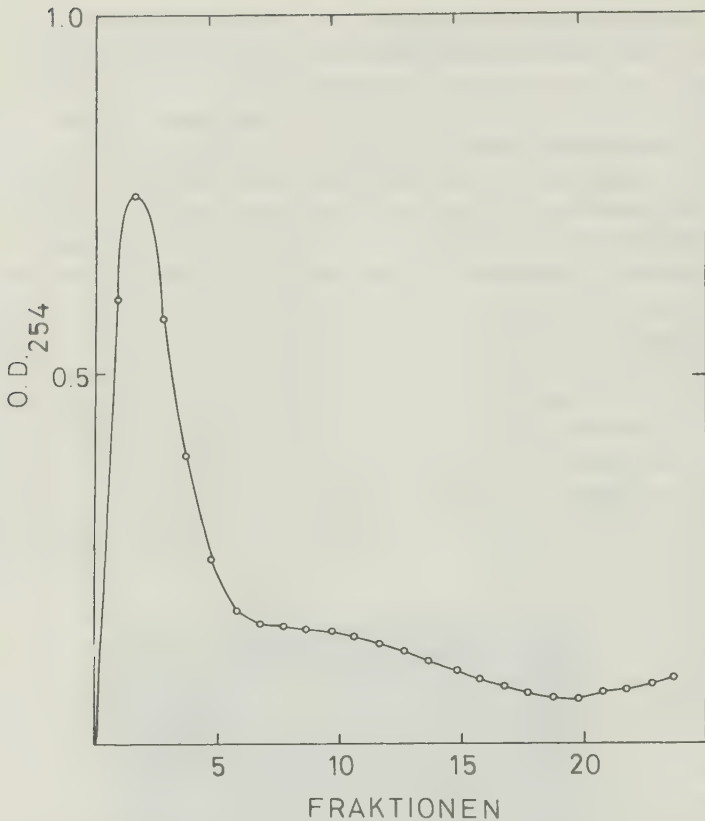


Abb. 11: Die aus einem CsCl-Ethidium Bromid Grad. gewonnene PV-DNS I wurde mit pankr. DNase behandelt (1 ml Ansatz enth.: 6-7 μ g PV-DNS I, 2.5×10^{-3} μ g DNase, 15 Min., 22°C). Nach der Vorreinigung in einem neutr. Sacch. Gradienten wurden die DNS-Fragmente kleiner als 12 S in einem zweiten neutralen Saccharose Gradienten zentrifugiert (5-20 %w/v, pH 7.4, 54 000 UpM, 2 Std. bei 20°C, Spinco SW 65 Rotor, Fa. Beckmann). Die Fraktionen wurden vom ob. Ende des Grad. entnommen und die opt. Dichte bei 254 nm simultan gemessen. Die Fraktionen 1-5 enthalten die PV-DNS Fragmente (< 12 S).

5. D i s k u s s i o n

Wie alle uns bekannten Viren können auch die onkogenen Polyoma - Viren sich nur innerhalb von geeigneten Säugetierzellen vermehren. Mäusenierenzellen zeigen dabei die höchste Empfänglichkeit für die Infektion mit diesen DNS-Viren(26). Der produktive Infektionszyklus in diesen permissiven Zellen beginnt bei Verwendung der konventionellen Infektionsmethode mit der Adsorption der Viren an Rezeptoren der Zelloberfläche. Auf diesen ersten Teilschritt der Infektion folgt die Penetration des Virions durch die Zellmembran und die Freisetzung der viralen DNS im Zellinneren(82). Die PV-DNS wird in den Zellkern transportiert, wo es schließlich zur Expression des viralen Genoms kommt. Über die Bedeutung dieser ersten Teilschritte für den produktiven Infektionszyklus ist uns noch recht wenig bekannt. Es war bisher ein ungeklärtes Problem, ob dieser Infektionsablauf eine notwendige Voraussetzung für die biologische Aktivität der Polyoma-Viren darstellt. Um eine Antwort auf diese offene Frage geben zu können, injizierten wir die Viruspartikel mit Mikroglaskanülen direkt in das Zellinnere von 3T3-Mäusezellen. Die Expression der frühen und späten viralen Gene wiesen wir an Hand der Bildung des virusspezifischen T - und V - Antigens mit Hilfe der indirekten oder direkten Immunfluoreszenzmethode in den infizierten Zellen nach. Die Färbung der 3T3-Zellen erfolgte 48 Stunden nach Injektion der Polyoma-Viren. Das T - Antigen fand sich in 100 % der infizierten Mäusezellen und das V - Antigen als Ausdruck der späten viralen Genexpression und Virusvermehrung konnten wir in 48 % der Zellen nachweisen. Diese Infektionseffizienz der Mikroinjektionsmethode entspricht den Werten, die man mit der klassischen Infektionstechnik erzielt. Aus diesen identischen Ergebnissen können wir schließen, daß der konventionelle Infektionsvorgang keine *conditio sine qua non* für die Infektiosität der Polyoma - Viren darstellt.

Das relativ einfach aufgebaute Polyoma-Virus besteht aus den Hüllproteinen VP 1 - VP 6 und der von diesem Cap-sid eingeschlossenen doppelsträngigen DNS(3). Den Nachweis dafür, daß die Nukleinsäure für die infektiösen Eigenschaften des Virions verantwortlich ist, konnte DI MAYORCA et al. bereits 1959 erbringen(46). Bei den Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe wurden allerdings permissive Mäusezellen mit der PV-DNS auf konventionelle Weise in der Zellkultur infiziert. Es ergab sich eine deutliche Reduktion der infektiösen Potenz bei der PV-DNS verglichen mit den Infektionsergebnissen des kompletten Virions. Zahlreiche Versuche in den folgenden Jahren, diese niedrige Ausbeute der viralen DNS - Infektion zu steigern, brachten nur eine geringfügige Erhöhung der Infektionseffizienz(48). Unsere Experimente sollten die Ursache dieser Infektiositätsminderung der PV-DNS klären helfen. Hierfür injizierten wir mit Hilfe der Mikroinjektionstechnik die native Form der Polyoma-DNS(PV-DNS I) in permissive 3T3-Mäusezellen. Nach 48 Stunden konnten wir in 100 %(!) der infizierten Zellen das virusspezifische T - Antigen und in 35 % der Zellen das V - Antigen nachweisen. Diese Prozentzahlen entsprechen in etwa den Werten, die man mit konventioneller Infektionsweise und nach Injektion der kompletten Viruspartikel in 3T3-Zellen erzielt(s. auch Tab. 1). Wir müssen aus diesem Ergebnis den Schluß ziehen, daß die Membran der infizierten Zelle eine nur sehr schwer zu überwindende Hürde für die virale DNS darstellt. Ob dieses Hindernis nun darin besteht, daß die DNS-Moleküle des Polyoma-Virus beim Einschleusungsvorgang in das Zellinnere geschädigt und damit inaktiviert werden oder einfach nicht eine ausreichend große Zahl an DNS - Molekülen die Zellmembran penetriert, können diese experimentellen Ergebnisse nicht klären.

Die native Polyoma-DNS(20 S) ist nicht die einzige mögliche Form der viralen DNS. Die in ihr vorliegende

superhelikale Struktur geht nach der Spaltung bereits einer Diesterbindung zwischen zwei Nukleotiden der viralen DNS in die ringförmige PV-DNS II(16 S) über(17). Das gesamte virale Genom liegt in dieser PV-DNS II noch vollständig vor. Die von uns untersuchte Frage war, ob die genetische Information dieser 'genickten' PV-DNS nach direkter Injektion mit Mikroglaskanülen in 3T3-Zellen in gleichem Umfang exprimiert werden kann wie die der PV-DNS I. Die infizierten Zellen wiesen nach 48 Stunden p.i. zu 34 % das T - Antigen und zu 12 % das V - Antigen auf. Diese Prozentzahlen für die Infektionseffizienz der PV-DNS II liegen deutlich unter den nach Injektion der PV-DNS I erzielten Werten. Dies gilt sowohl für die frühe als auch für die späte virale Genexpression. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den bereits 1963 von DULBECCO und VOGT(15) gemachten Angaben überein, obwohl die Autoren damals die konventionelle Infektionsmethode verwendeten und nur ungefähre Werte für die Infektionsminderung der PV-DNS II mit Hilfe des Plaquetestes angegeben werden konnten. Wir müssen aus diesen Versuchsergebnissen den Schluß ziehen, daß die pankreatische DNase in einem großen Teil der PV-DNS I - Moleküle zu viele der Diesterbindungen gespalten hat und damit zahlreiche virale Gene irreparabel geschädigt wurden. Dieses Enzym hat demnach nicht nur eine Konformationsänderung der superhelikalen PV-DNS I bewirkt, sondern auch den Verlust der biologischen Aktivität von vielen Molekülen der PV-DNS II zur Folge gehabt.

Der produktive Infektionszyklus der Polyoma-Viren in permissiven Mäusezellen ist durch eine frühe und späte Phase der viralen Genexpression gekennzeichnet(s. auch die Abb. 1 und 9). Die frühe Phase beginnt mit der Synthese der 19S mRNS(58) gefolgt von der Synthese des virusspezifischen T - Antigens und der Stimulation der zellulären DNS-Synthese. Die virale DNS-Replikation ist bereits Bestandteil der späten Phase der Virusinfektion

und findet nur in permissiven Zellen statt. Es wird nun die späte virale mRNS(16 S) gebildet und in den Zellkernen läßt sich das V - Antigen nachweisen. Aus dem vereinfachten Schema(s.Abb. 9) ist zu ersehen, daß die frühen und späten viralen Gene voneinander getrennt jeweils auf den komplementären DNS-Strängen des Polyoma-Virus angeordnet sind und in entgegengesetzter Richtung transkribiert werden. Wir trennten die doppelsträngige PV-DNS II bei alkalischem pH in einen linearen(16 S) und einen zirkulären(18 S) Einzelstrang und untersuchten deren biologische Aktivität in 3T3-Zellen zuerst nach getrennter Injektion beider DNS-Formen. Es muß in diesem Zusammenhang betont werden, daß die Trennung in Einzelstränge nur auf Grund des unterschiedlichen Sedimentationsverhaltens im alkalischen Saccharose Gradienten erfolgte und keine Strangselektion bedeutete. In beiden Präparationen sind sowohl die frühen als auch die späten viralen Gene enthalten. Beide Formen der PV-DNS induzierten in 32 % der infizierten 3T3-Zellen das T - Antigen als Ausdruck der frühen viralen Genexpression. Dieses Ergebnis bestätigt unsere weiter oben geäußerte Vermutung, daß in beiden Einzelsträngen das gesamte virale Genom enthalten sein muß. Dennoch konnten wir in keiner der infizierten Zellen das V - Antigen als Ausdruck der späten viralen Genexpression nachweisen.

Vermischt man aber die 16 S und 18 S PV-DNS miteinander und injiziert diese gemeinsam in 3T3-Mäusezellen, so synthetisieren 6 % der infizierten Zellen auch das V - Antigen. Die folgenden Überlegungen sollen dazu beitragen, dieses Ergebnis mit uns bereits bekannten Tatsachen in Übereinstimmung zu bringen und dann daraus eine neue Hypothese der Regulation der späten Genexpression des Polyoma-Virus zu entwickeln.

Mit verschiedenen Methoden konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, daß die virale DNS-Synthese eine unabdingbare Voraussetzung für die Transkription der späten

Gene der Polyoma- und auch der SV₄₀-Viren darstellt. ECKHART(55,56) untersuchte eine thermosensitive Mutante (tsA) des Polyoma-Virus, die bei der nicht-permissiven Temperatur von 41° C keine virale DNS-Replikation und keine Transcription der späten Gene aufweist. Ist die Replikation der DNS jedoch erst einmal bei der permissiven Temperatur von 33° C angelaufen, so findet man auch bei erneut eingestellten 41° C für begrenzte Zeit eine Synthese der späten viralen mRNS. Den gleichen Zusammenhang zwischen viraler DNS-Replikation und später Genexpression konnte WEIL(57,58) mit einem ganz anders gearbeteten Versuchsansatz für die Polyoma-Viren belegen. Er hemmte die zelluläre und virale DNS-Synthese mit 5-Fluorodesoxyuridin(FUdR) oder Cytosinarabinosid(ara C) und untersuchte die virale mRNS-Synthese in der späten Phase der Infektion mit DNS-RNS Hybridisierungsexperimenten. Mit dieser Technik lassen sich komplementäre DNS- und RNS-Stränge oder auch einzelne Abschnitte auf diesen identifizieren und das Ausmaß der Transcription beurteilen. Wurde bei diesen Versuchen die DNS-Synthese vor der Infektion mit den PV-Viren gehemmt, so fand sich wohl frühe aber keine späte virale mRNS in den Mäusezellen. Hatte die virale DNS-Replikation in den infizierten Zellen aber erst einmal begonnen, so wurden die späten Gene auch noch nach der Hemmung der DNS-Synthese mit FUdR oder araC für eine gewisse Zeit nachweisbar exprimiert. Das Fehlen der V - Antigensynthese bei unseren Injektionsexperimenten mit den beiden PV-DNS-Einzelsträngen muß im Zusammenhang mit dieser notwendigen viralen DNS-Replikation gesehen werden. Von GRAESSMANN et al.(59) wurde angesichts dieser Ergebnisse die Hypothese aufgestellt, daß für die späte Genexpression von Polyoma- und SV₄₀-Viren eine spezifische räumliche Konfiguration der Virus-DNS erforderlich ist, die nur in einem sich replizierenden DNS-Molekül gegeben ist. Diese sog. replikative Form der DNS kann von dem linearen oder zirkulären DNS-Einzelstrang allein nicht ausgebildet wer-

den. Es wird daher keine späte virale mRNS transkribiert und die V - Antigenfärbung muß negativ bleiben. Nur eine gemeinsame Injektion der 16 S und 18 S PV-DNS ermöglicht die intrazelluläre Ausbildung der notwendigen replikativen Zwischenform der Virus-DNS und damit die Ablesung der späten Gene.

Zur weiteren Stützung dieser Hypothese untersuchten wir die virale Genexpression einer linearen doppelsträngigen PV-DNS nach der Injektion in 3T3-Zellen. Diese PV-DNS III wird durch die Spaltung mit der Endonuklease EcoRI aus der PV-DNS I gebildet (s. Abb. 2 und 9). Von diesem Restriktionsenzym ist bekannt, daß es den DNS-Doppelstrang immer an einer einzigen Stelle mit typischer Basensequenz spaltet. In dieser PV-DNS III ist die gesamte Geninformation des PV-Virus enthalten. Um eine intrazelluläre Rezyklisierung dieser linearen DNS und damit die mögliche Ausbildung einer replikativen Form zu verhindern, spalteten wir die endständigen komplementären Nukleotide (sticky ends) mit der Nuklease S_1 ab. Nach der Injektion dieser PV-DNS in 3T3-zellen konnten wir das V - Antigen weder nach 24 noch nach 48 Stunden p.i. in den infizierten Zellen nachweisen. Dieses Fehlen der Synthese der viralen Capsidproteine nach Injektion einer doppelsträngigen linearen PV-DNS ist ein weiterer Beleg dafür, daß die Transcription der späten viralen Gene nur von einer ganz bestimmten Konfiguration der Polyoma-DNS aus erfolgen kann. Die mit dem EcoRI- und S_1 -Enzym behandelte PV-DNS enthält das gesamte virale Genom und unterscheidet sich von der nativen PV-DNS I nur durch den fehlenden Ringschluß. Dem Fehlen von ca. 6 Nukleotiden durch die S_1 -Behandlung wird von uns keine Bedeutung beigemessen. Demnach scheint der zirkulär geschlossene Doppelstrang - wie er z.B. in der PV-DNS I oder II vorliegt - eine notwendige Vorstufe für die replikative Form der Polyoma-DNS zu sein.

Auch die Synthese des frühen T - Antigens blieb in diesem Versuch nach der Injektion der linearen doppel-

strängigen PV-DNS aus. Wie bereits oben erwähnt und aus der Abb. 9 zu ersehen, spaltet die Endonuklease EcoRI den Doppelstrang der Virus-DNS im Bereich der frühen viralen Gene, zu denen das Gen für das T - Antigen gehört. Wir müssen auf Grund dieses negativen Ergebnisses annehmen, daß die Spaltungsstelle der Endonuklease gerade in diesem Gen lokalisiert ist und somit eine vollständige Synthese dieses Proteins nicht mehr möglich ist.

Gegen diese Schlußfolgerung konnte jedoch eingewendet werden, daß ein linearer Doppelstrang der PV-DNS grundsätzlich nicht transcribierbar ist. Wir spalteten daher die PV-DNS I mit pankreatischer DNase in zahlreiche kleine doppelsträngige Fragmente (12 S) und untersuchten deren biologische Aktivität in Mäusezellen. Da die Spaltstellen völlig willkürlich über das gesamte virale Genom verstreut sind und somit theoretisch jedes Gen betroffen sein kann, fanden wir nur noch in 8 % der infizierten Zellen eine Synthese des frühen T - Antigens. Das V - Antigen konnten wir in keiner der Zellen nachweisen, obwohl die entsprechende genetische Information mit großer Sicherheit auch in diesen kleinen Fragmenten der PV-DNS enthalten ist. Dieses Versuchsergebnis stützt zwei der von uns gemachten Annahmen: (a). Die frühen viralen Gene können auch von einem linearen Doppelstrang der Polyoma-DNS exprimiert werden, wenn auch in vermindertem Umfang. (b). Die Transcription der späten viralen Gene bedarf auch bei vollständigem Vorliegen der entsprechenden DNS-Abschnitte einer bestimmten Konfiguration der viralen DNS, die nur in einem sich replizierenden DNS-Molekül gegeben ist.

6. Z u s a m m e n f a s s u n g

Onkogene Polyoma-Viren wurden mit Hilfe von Mikroglaskanülen in Mäusezellen injiziert und auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. In allen mit den kompletten Viruspartikeln infizierten Zellen (100 %) konnte das T - Antigen als Parameter für die Expression der frühen viralen Gene nachgewiesen werden. Eine späte virale Genexpression und damit eine Vermehrung der Polyoma-Viren wiesen 42 % der Mäusezellen auf. Diese mit der Mikroinjektionstechnik erzielten Resultate entsprechen den Ergebnissen bei Verwendung der konventionellen Infektionsmethode.

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Ursache für die geringe Infektiosität der DNS des Polyoma-Virus in der Zellmembran der auf konventionelle Weise infizierten Zelle zu suchen ist. Nach der Injektion der viralen DNS mit Mikroglaskanülen direkt in das Zellinnere wies die Nukleinsäure des Polyoma-Virus die gleiche Infektionseffizienz auf wie das vollständige Viruspartikel.

Die Konformationsänderung der PV-DNS I zur PV-DNS II nach einer milden DNase-Behandlung führte zu einer Verminderung der biologischen Aktivität der viralen DNS. Von dieser in 3T3-Mäusezellen injizierten PV-DNS II wurden nur noch in 34 % der Zellen die frühen viralen Gene und in 12 % die späten viralen Gene exprimiert.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der experimentellen Überprüfung einer von GRAESSMANN aufgestellten Hypothese, daß die Replikation der PV-DNS eine notwendige Voraussetzung für die Expression der späten viralen Geneanteile darstellt. Die Ergebnisse nach der Injektion von Einzelstrangformen der Virus-DNS und von einer linearen doppelsträngigen Form der PV-DNS in permissive Mäusezellen machen diesen bisher nur vermuteten Kausalzusammenhang sehr wahrscheinlich.

Den Abschluß der Arbeit bildet der experimentelle Nachweis der biologischen Aktivität von Fragmenten der PV-DNS. Diese kleinen linearen doppelsträngigen DNS-Fragmente des Polyoma-Virus induzierten in 8 % der mit der Mikroinjektionstechnik infizierten Mäusezellen eine frühe virale Genexpression.

7. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Heidelberger, Ch.
Advanc. Cancer Res. (1973) 18, 317
2. Borek, C. und L. Sachs
Nature (1966) 210, 276
3. Tooze, J.
'The molecular biology of tumour viruses', Hrsg. Tooze, J.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1973
4. Yamagiwa, K. und K. Ichikawa
J. Cancer Res. (1918) 3, 1
5. Rous, P.
J. Exp. Med. (1911) 13, 397
6. Bather, R.
Brit. J. Cancer (1957) 11, 611
7. Epstein, M. A.
Nature (1958) 181, 1808
8. Gross, L.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1953) 83, 414
9. Stewart, S. E., Eddy, B.E. und N. G. Borgese
in 'Perspectives in virology', Hrsg. M. Pollard, Wiley
and sons, New York 1959
10. Sweet, B. H. und M. R. Hilleman
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1960) 105, 420
11. Shope, R. E. und E. W. Hurst
J. Exp. Med. (1933) 58, 607

12. Melnick, J. L.
Science (1962) 135, 1128
13. Klug, A.
J. Mol. Biol. (1965) 11, 424
14. Mattern, C. F. T., Takemoto, K. K. und A. M. De Leva
Virology (1967) 32, 378
15. Dulbecco, R. und M. Vogt
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1963) 50, 236
16. Weil, R. und J. Vinograd
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1963) 50, 730
17. Vinograd, J., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R.
und P. Laipis
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1965) 53, 1104
18. Crawford, L., Dulbecco, R., Fried, M., Montagnier, L.
und M. Stoker
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1964) 52, 148
19. Caro, L. G.
Virology (1965) 25, 226
20. Westphal, H.
J. Mol. Biol. (1970) 50, 407
21. Crawford, L. V.
Brit. Med. Bul. (1973) 29, 253
22. Frearson, P. M. und L. V. Crawford
J. Gen. Virol. (1972) 14, 141
23. Fey, G. und B. Hirt
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1974) XXXIX, 235

24. Seehafer, J. G. und R. Weil
Virology (1974) 58, 75
25. Stewart, S. E., Eddy, B. E., Gochenour, A. M.,
Borgese, N. G. und G.E. Grubbs
Virology (1957) 3, 380
26. Winocour, E.
Virology (1963) 19, 158
27. Weil, R., Michel, M. R. und G. K. Ruschmann
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1965) 53, 1468
28. Weil, R. und J. Kára
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1970) 67, 1011
29. Pétursson, G. und R. Weil
Arch. Gesamte Virusforsch. (1968) 24, 1
30. Dulbecco, R., Hartwell, L. H. und M. Vogt
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1965) 53, 403
31. Green, M.
Ann. Rev. Bioch. (1970) 39, 701
32. Habel, K.
Virology (1965) 25, 55
33. Fogel, M. Gilden, R. und V. Defendi
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1967) 124, 1047
34. Graessmann, M., Graessmann, A., Niebel, J., Koch, A.,
Fogel, M. und C. Müller
Nature (1975) im Druck
35. Stoker, M.
Nature (1968) 218, 234

36. Martin, M. A. und D. Axelrod
Science (1969) 164, 68
37. Kamen, R., Lindstrom, D. M., Shure, H. und R. W. Old
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1974) XXXIX, 187
38. Benjamin, T. L.
J. Mol. Biol. (1966) 16, 259
39. Axelrod, D., Habel, K. und E. T. Bolton
Science (1964) 146, 1466
40. Westphal, H. und R. Dulbecco
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1968) 59, 1158
41. Fogel, M. und R. Dulbecco
Virology (1969) 37, 327
42. Vogt, M. und R. Dulbecco
Proc. Nat. Acad. Sci. (1960) 46, 365
43. Sachs, L. und D. Medina
Nature (1961) 189, 457
44. Stoker, M.
Virology (1964) 24, 165
45. MacPherson, I. und M. Stoker
Virology (1962) 16, 147
46. Di Mayorca, G., Eddy, B., Stewart, S., Hunter, W.
Friend, C. und A. Bendlich
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1959) 45, 1805
47. Weil, R.
Virology (1961) 14, 46

48. Pagano, J. S.
in 'Fundamental Techniques in Virology', Academic Press
New York, London (1969) S. 184
49. Gruen, R., Graessmann, M., Graessmann, A. und M.
Fogel
Virology (1974) 58, 290
50. Graessmann, A.
Exp. Cell Res. (1970) 60, 273
51. Graessmann, A. und M. Graessmann
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie (1971) 352, 527
52. Graessmann, M., Graessmann, A., Hoffmann, E., Niebel, J.
und K. Pilaski
Mol. Biol. Rep. (1973) 1, 233
53. Crawford, L. V. und M. J. Waring
J. Mol. Biol. (1967) 25, 23
54. Radloff, R., Bauer, W. und J. Vinograd
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1967) 57, 1515
55. Franke, B. und W. Eckhart
Virology (1973) 55, 127
56. Eckhart, W.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1974) XXXIX, 37
57. Hudson, J., Goldstein, P. und R. Weil
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1970) 65, 226
58. Weil, R., Salomon, C., May, E. und P. May
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1974) XXXIX, 381

59. Graessmann, M., Graessmann, A. und C. Mueller
in Vorbereitung
60. Lehmann, I. R., Roussos, G. G. und E. A. Pratt
J. Biol. Chem. (1962) 237, 819
61. Griffin, B. E., Fried, M. und A. Cowie
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1974) 71, 2077
62. Fried, M., Griffin, B. E., Lund, E. und D.L.Robberson
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. (1974) XXXIX, 45
63. Dulbecco, R. und G. Freeman
Virology (1959) 8, 396
64. Smith, J. D., Freeman, G., Vogt, M. und R. Dulbecco
Virology (1960) 12, 185
65. Todaro, G. und H. Green
J. Cell Biol. (1963) 17, 299
66. MacPherson, J. und L. Montagnier
Virology (1964) 23, 291
67. Crawford, L. V.
in 'Fundamental Techniques in Virology', Academic Press,
New York, London (1969)
68. Winocour, E.
Advanc. Virus Res. (1969) 14, 153
69. Sachs, L., Fogel, M. und E. Winocour
Nature (1959) 183, 663
70. Crawford, L. V.
Virology (1963) 19, 279

71. Hirt, B.
J. Mol. Biol. (1967) 26, 365
72. Graessmann, A., Graessmann, M. und M. Fogel
Develop. Biol. (1973) 35, 180
73. Cuzin, F., Vogt, M., Dieckmann, M. und P. Berg
J. Mol. Biol. (1970) 47, 317
74. Dingman, C. W., Fisher, M. P. und T. Kakefuda
Biochemistry (1972) 11, 1242
75. Graessmann, A., Graessmann, M., Bobrik, R., Hoffmann, E.,
Lauppe, F. und C. Mueller
FEBS-Letters (1976) im Druck
76. Vogt, V. M.
Eur. J. Biochem. (1973) 33, 192
77. Germond, J.E., Vogt, V. M. und B. Hirt
Eur. J. Biochem. (1974) 43, 591
78. Sharp, Ph. A., Sugden, B. und J. Sambrook
Biochemistry (1973) 12, 3055
79. Graessmann, A.
Doktorarbeit (1968), Freie Universität Berlin
80. Graessmann, M. und A. Graessmann
Proc. Nat. Acad. Sci. (1976) im Druck
81. Bollum, F. J.
J. Biol. Chem. (1959) 234, 2733
82. Crawford, L. V.
Virology (1962) 8, 177

Lebenslauf

Am 11.2.1947 wurde ich als fünftes Kind des Diplomlandwirts Dr. Werner Pilaski und seiner Ehefrau Christel Pilaski, geb. Naraschewski, in Monheim/Krs. Donauwörth geboren. Meine Familie stammt aus Königsberg/Pr. und fand nach der Vertreibung in Oldenburg/Oldb. 1950 einen neuen Wohnsitz. Dort besuchte ich von 1953 bis 1957 die Volksschule und dann von 1957 bis zum Abitur 1966 das Alte Gymnasium Oldenburg.

Im Anschluß an die Reifeprüfung studierte ich vier Semester Rechtswissenschaften in Hamburg und Freiburg und begann im WS 1968/69 das Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin.

Das vorklinische Studium schloß ich nach fünf Semestern mit dem Physikum im WS 1970/71 ab und beendete ebenfalls an der FU Berlin das Medizinstudium mit dem Staatsexamen im SS 1974.

Neben der klinischen Ausbildung arbeitete ich als Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. A. Gräßmann am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der FU Berlin.

Ab Oktober 1974 leistete ich das Pflichtjahr als Medizinalassistent an verschiedenen Berliner Krankenhäusern ab und arbeitete von Oktober bis Dezember 1975 erneut an dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie. Seit Januar 1976 bin ich als wissenschaftlicher Assistent an der chirurgischen Universitätsklinik im Klinikum Westend der FU Berlin tätig.

Ich bin seit 1972 mit der jetzigen Medizinalassistentin Christiane Pilaski verheiratet und habe eine 3jährige Tochter.

